

# 小胞体ストレス応答におけるリボソームユビキチン化の機能解析

著者	松木 泰子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19394号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00132957">http://hdl.handle.net/10097/00132957</a>

博士論文（要約）

小胞体ストレス応答における  
リボソームユビキチン化の機能解析

令和元年度

東北大学大学院薬学研究科

生命薬科学専攻

松木 泰子

## 【研究背景・目的】

遺伝子発現の根幹であるセントラルドグマにおいて、DNA の保持する遺伝情報は、RNA へと転写され、mRNA へとプロセッシングされたのちに、リボソームによりタンパク質へと翻訳される。このように遺伝子発現は非常に複雑な多段階反応により構成されている中でも、翻訳段階では、タンパク質の安定性、フォールディングや細胞内局在、さらには mRNA の安定性までが制御されていることが、近年の研究により明らかとなってきた(Hanson and Collier 2017; Mardakheh *et al.*, 2015; Rodnina 2016)。このように、翻訳段階の厳密な制御は、細胞の機能維持や生命機能維持に重要であると考えられ、申請者所属研究室をはじめとした国内外の多くのグループにより、翻訳異常に起因した品質管理機構の解析が進められてきた。

これまでに申請者所属研究室では、出芽酵母を用いた解析により、翻訳途中にリボソームが停滞した場合、迅速な mRNA の分子内切断と合成途中の新生ポリペプチド鎖のプロテアソーム依存的分解が誘導されることを報告した(Inada and Aiba 2005; Ito-Harashima *et al.*, 2007; Dimitrova *et al.*, 2009)。また最近では、異常翻訳に起因する品質管理機構が正常に作動するために必須な修飾として、リボソーム構成タンパク質のユビキチン化(以下リボソームユビキチン化)を報告した(Matsuo, Ikeuchi *et al.*, 2017)。Ribosome-associated quality control (RQC)は、リボソームが mRNA 上で異常停滞した際に誘導される新生ペプチド鎖の品質管理機構である(Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman *et al.*, 2012; Defenouillere *et al.*, 2013)。RQC の初期段階において、異常停滞を引き起こしたリボソームは、mRNA 上で特定のタンパク質がユビキチン化される。出芽酵母では、E3 ユビキチン付加酵素 Hel2 がリボソーム小サブユニット構成タンパク質 uS10 の K6/8 残基をユビキチン化することが RQC の誘導に必須であることが明らかとなっている(Ikeuchi *et al.*, 2019; Matsuo *et al.*, 2017; Sitron *et al.*, 2017)。申請者所属研究室ではさらに、リボソーム小サブユニット構成タンパク質である uS3 のユビキチン化が、機能不全 18S rRNA

の分解機構(18S NRD)に必須な役割を果たすことを報告した(Sugiyama *et al.*, 2019)。このように、リボソームユビキチン化が翻訳段階における品質管理機構において非常に重要なシグナルであることが明らかとなっていたが、その生理的意義については不明な点が多く残されていた。また、近年、哺乳類細胞において、小胞体ストレスに依存したリボソームタンパク質のユビキチン化が報告された(Higgins *et al.*, Mol. Cell, 2015)。折りたたみ不全タンパク質の蓄積に起因する小胞体ストレスは、細胞にとって有害であり、小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response; UPR)によって除去され、UPR の活性化により、分子シャペロン等のUPR 関連遺伝子群の転写が活性化されることが明らかとなっているが、リボソームユビキチン化が UPR 経路においてどのように関与するかは不明であった。申請者は、最も単純なモデル真核生物出芽酵母を用いて、小胞体ストレス応答におけるリボソームユビキチン化の分子メカニズムや、その機能について解析を行なった。

#### 【実験結果・考察】

出芽酵母 KO ライブラリを用いて、小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin に感受性を示す変異株を探索した結果、小胞体ストレス下における生育に必須な E3 ユビキチンライゲースとして Not4 を同定した。Not4 はリボソームに結合する E3 ユビキチンライゲースであり、リボソーム 40S サブユニット構成タンパク質である eS7a の K83 残基もしくは K84 残基を介したモノユビキチン化を担うことが報告されている(Panasenko *et al.*, Mol. Microbiol. 2012; Ikeuchi *et al.*, EMBO J. 2019)。実際に、出芽酵母において、tunicamycin 添加後経時的に Not4 に依存して eS7a のユビキチン化が亢進することを確認した。また過去の関連実験において、eS7a の脱ユビキチン化酵素として、Ubp3-Bre5 が同定されており(横尾 修士論文 2018)、Not4 による eS7a のユビキチン化と Ubp3-Bre5 による脱ユビキチン化の制御が、出芽酵母 UPR において重要な機能を担っていることが明らかとなった。

次に申請者は、出芽酵母 UPR における eS7a のユビキチン化の機能に着目し解析を行った。高等真核生物 UPR では、小胞体膜タンパク質である PERK のリン酸化により eIF2  $\alpha$  がリン酸化されることで、細胞全体の翻訳開始が阻害され、新たに翻訳され小胞体へ送り込まれるタンパク質量を抑制するという経路がよく知られている。先述した文献においても、UPR におけるリボソームユビキチン化の機能として、翻訳制御に関わる可能性が示唆されていた。一方で、出芽酵母における翻訳抑制経路の存在は不明であった。これらの知見から、eS7a ユビキチン化が出芽酵母 UPR において翻訳制御を担う可能性を想定し、puromycin 取り込みアッセイを用いて、野生型出芽酵母株と eS7a ユビキチン化欠損株における細胞全体の翻訳量を解析したが、eS7a のユビキチン化に依存した細胞全体の翻訳制御は観察されなかった。したがって、eS7a のユビキチン化に依存した個々の遺伝子の翻訳制御の変化について、解析を試みた。所属研究室松尾助教によるリボソームプロファイリング解析の結果、UPR において、eS7a のユビキチン化により翻訳効率が正に制御される遺伝子と負に制御される遺伝子が存在することが明らかとなった。翻訳効率が正に制御される遺伝子として、出芽酵母 UPR に必須な転写因子 Hac1 をコードする *HAC1i* (induced)を見出した。また、負に制御される遺伝子として、Histidine triad NucleoTide-binding 1(Hnt1)をコードする *HNT1* を見出した。それぞれの遺伝子について、翻訳制御に関係するシス配列を解析した。*HAC1* の最初のエキソンを GFP に置換した変異体では、eS7a ユビキチン化に依存した翻訳抑制が観察されなかったことから、*HAC1* の最初のエキソン配列が eS7a ユビキチン化を介した制御機構において必須であることが明らかとなった。また、*HNT1* について、UPR において 3 番目の upstream ORF(uORF)における翻訳効率が低下することにより、main ORF からの翻訳も抑制されるが、eS7a ユビキチン化変異株ではこのような制御が観察されなくなることを見出し、uORF を介した翻訳制御において eS7a のユビキチン化が重要な役割を担うことを明らかとした。これらの mRNA におけ

る翻訳制御に対し、eS7a ユビキチン化がどのように関与しているかを明らかにするため、東京都医学総合研究所の佐伯博士・田中博士との共同研究による MS 解析により、トランス因子の同定を試みた。その結果、UPR において、eS7a のユビキチン化依存にリボソームへ結合する因子として、Yef3 を同定した。翻訳伸長因子である Yef3 は、tunicamycin 添加により、eS7a のユビキチン化依存且つ Hac1 依存に、リボソームと共沈した。しかしながら、Yef3 の詳細な関与については未だ未解明であり、他の翻訳関連因子も含めた、eS7a ユビキチン化による翻訳制御機構の解明が急務である。

以上の結果から、eS7a のユビキチン化による翻訳段階の厳密な制御が、出芽酵母 UPR が正常に機能するために必須であるというモデルを提唱する。